

Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXVIII. N° 2. Año 2006. 91-100.



Propagación de *Lecanophora heterophylla*. Especie nativa con potencial ornamental¹

Propagation of *Lecanophora heterophylla*.
A native specie with ornamental potencial

María T. Ponce²
Eugenia Videla³
Sonia Fioretti³
Eugenia Galat²

Originales
Recepción: 12/04/2006
Aceptación: 03/10/2006

RESUMEN

En este trabajo se presentan estudios de germinación y propagación *in vitro* de *L. heterophylla*, nativa con potencial ornamental. Se evaluó el efecto del momento y lugar de recolección sobre la germinación. Se recolectaron semillas en plena floración y al final de la misma, en dos localidades de la provincia de Mendoza: Gualtallary y Chacras de Coria. Las pruebas de germinación se realizaron en estufa a 20 °C. Las semillas provenientes de Gualtallary germinaron en mayor proporción que las de Chacras de Coria: en ambas localidades la máxima germinación se obtuvo en la recolección de plena floración. Para establecer un protocolo de micropropagación se realizaron dos ensayos de introducción y uno de multiplicación. En la introducción se evaluó el medio de cultivo MS entero o ½ de macronutrientes, en combinación con BA y AIB. En la multiplicación se evaluaron los medios MS ½ o ¼ de macronutrientes con 20 o 40 g.L⁻¹ de sacarosa. No se encontraron diferencias en la sobrevivencia, el BA incrementó significativamente la proliferación de brotes. El mejor medio de multiplicación fue MS ¼ adicionado de 20 g.L⁻¹ de sacarosa.

SUMMARY

Lecanophora heterophylla is a native species with ornamental potential. In this work germination and *in vitro* propagation experiment are reported. The effects of time of seed maturation and site of origin on germination behavior were evaluated. Seeds were collected during full and end blooming stage, in two locality of Mendoza province: Gualtallary y Chacras de Coria. Germination test at 20 °C were carried out in incubators. Percentage of germination was higher when seeds came from Gualtallary than Chacras de Coria. In both site of origin the best germination rate was obtained when the collection of seed was during full blooming. In order to obtain a micropropagation protocol two establishment and one multiplication experiments were performed. Full or half Murashige Skoog (MS) media in combination with BA and AIB were tested in the establishment stage. Half and quarter strength MS media with 20 or 40 g.L⁻¹ of sucrose were assayed at multiplication stage. No differences in survival were found, shoot proliferation were significantly increased by BA. The best multiplication media was MS ¼ with 20 g.L⁻¹ of sucrose.

Palabras clave

germinación • micropropagación • autóctonas • Malvaceae

Key words

germination • micropropagation • autochthonous • Malvaceae

- 1 Trabajo parcialmente financiado por Proyecto INTA 1837 y Proyecto SECTYP, UNCuyo N° 06/A283. Serie Ornamentales: Nativas herbáceas.
- 2 Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. mponce@fca.uncu.edu.ar
- 3 Dpto. de Producción Agropecuaria.

INTRODUCCIÓN

El germoplasma sudamericano ha tenido una importante participación en la difusión de variedades comerciales de plantas de jardín y de flores de corte; ejemplo de esto son las petunias, verbenas, portulacas, calceolarias o alstroemerias cultivadas en el mundo que derivan de material argentino (2). Sin embargo, en el país, el uso de recursos genéticos nativos para el desarrollo de plantas ornamentales está aún escasamente explotado.

En el oeste árido argentino existe un número importante de especies indígenas con potencial estético que, sin dudas, presentan ventajas adaptativas cuando se diseñan jardines de bajo consumo de agua. En Mendoza, desde hace varios años y en concordancia con otras zonas del país, se está trabajando con un número importante de estas especies: *Glandularia perakii* (3, 7), *Aristida mendocina*, *Pappophorum caespitosum*, *Trichloris crinita*, *Schizachyrium plumigerum* (13) y *Stipa ichu* (14).

Entre ellas, resulta de gran interés *Lecanophora heterophylla* (Cav.) Krapovickas, herbácea perenne de la familia Malvaceae que habita desde el norte de la Patagonia hasta Tucumán (6). Posee una gran amplitud ecológica (10), se encuentra en comunidades muy diversas de llanura o montaña y ocupa casi toda la provincia de Mendoza.



Flor de *L. heterophylla*



Ambiente natural de *L. heterophylla*

La planta mide hasta 60 cm de alto y tiene una raíz profunda. Las láminas foliares, menores de 8 cm, son muy variables, desde hojas basales lobadas hasta las superiores trilobadas, laciniadas, hastadas o lineares. Los racimos terminales agrupan pocas flores de 4 cm de diámetro, de color rosado fuerte con el centro rojo vinoso, con antesis secuencial (10) que le otorgan una prolongada floración.

Al estudiar factores tales como edad de la semilla, temperatura de germinación y tratamientos con ácido giberélico, Videla et al. (15) encontraron escasos porcentajes de germinación, resultados comunes a otros miembros de la familia Malvaceae (1).

Basados en estos antecedentes y en el hecho de que la producción de semillas es continua a lo largo del período de floración se evaluó el poder germinativo de las semillas recolectadas en distintos momentos de dicho período y procedentes de dos localidades. Cabe señalar que el cultivo de tejidos es una técnica de propagación en condiciones totalmente asépticas en la que, a partir de un pequeño segmento inicial de tejido, es posible regenerar en poco tiempo un gran número de plantas genéticamente iguales a la planta madre. Por otra parte, se estableció un protocolo de micropropagación con el fin de obtener un lote de material suficiente y homogéneo para estudios fenológicos y de comportamiento en el cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de germinación

La recolección de semillas de *L. heterophylla* se llevó a cabo en la localidad de Chacras de Coria (32° 59' S, 68° 53' W, 1000 msnm), Departamento Luján de Cuyo y en la localidad de Gualtallary (33° 23' S, 69° 13' W, 1249 msnm), Departamento Tupungato, ambas de la provincia de Mendoza.

Se recolectaron semillas en plena floración y hacia el final de dicha condición. En Chacras de Coria esta tarea se llevó a cabo desde octubre a marzo y en Gualtallary, desde febrero a abril.

Las pruebas de germinación se realizaron en caja de Petri, sobre papel absorbente, en estufa a 20 °C. Se emplearon 25 semillas por tratamiento y en todos los casos se efectuaron tres repeticiones. Para disminuir la carga de patógenos que el material trae de campo, se empleó solución de 1 g.L⁻¹ de Captan y Benomyl .

Los recuentos de semillas germinadas, aquellas en que la radícula atravesó los tegumentos, se hicieron semanalmente durante dos meses.

Para el análisis de los datos se utilizó el software Stathistica Plus Versión 4.0 aplicando el procedimiento de comparación de proporciones.

Ensayos de micropropagación

Se obtuvieron plantas a partir de semillas recolectadas en Chacras de Coria. Las plantas fueron colocadas en invernáculo durante 30 días con el objeto de producir nuevo crecimiento y disminuir el nivel de patógenos.

Los brotes provenientes del nuevo crecimiento se esterilizaron con alcohol 70 % durante un minuto seguido de solución comercial de hipoclorito de sodio al 15 %, (55 g.L⁻¹ de principio activo) durante 10 minutos; transcurrido este tiempo se enjuagaron tres veces con agua estéril.

Para el establecimiento *in vitro* se realizaron dos introducciones consecutivas. En la primera se sembraron 17 estaquillas uninodales por tratamiento en tubos de ensayo con 20 ml de medio MS (8) adicionado con 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 7 g.L⁻¹ de agar, el

pH se ajustó a 6 con KOH 0,1 N antes del autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Se ensayaron tres concentraciones de bencilaminopurina (BA): 0; 0,1 y 1 mg.L⁻¹. En la segunda introducción se sembraron 25 estaquillas uninodales por tratamiento en tubos de ensayo con 20 ml de medio MS con macronutrientes diluidos a la mitad, con iguales cantidades de sacarosa, agar agar y el mismo pH; en este caso se probaron distintas combinaciones de BA y ácido indól butírico (AIB) (tabla 1).

Tabla 1.

Concentraciones de reguladores del crecimiento en la 2ª introducción *in vitro* de *Lecanophora heterophylla*.

BA mg.L ⁻¹	AIB mg.L ⁻¹
0	0
0	0,01
0	0,1
0,5	0
0,5	0,01
0,5	0,1

En ambos casos, a los 45 días se evaluó el porcentaje de explantos con crecimiento (sobrevivencia), altura de planta, número de brotes y número de nudos.

De las plantas crecidas en la segunda introducción se extrajeron ápices y se realizó un ensayo de multiplicación que consistió en el medio MS con macronutrientes diluidos a la mitad o a un cuarto, sin reguladores del crecimiento y adicionado de 20 o 40 g.L⁻¹ de sacarosa. El medio se solidificó con agar agar a razón de 7 g.L⁻¹ y el pH se ajustó a 6 con KOH 0,1 N. En este ensayo los explantos se cultivaron en frascos de vidrio de 360 ml de capacidad con 60 ml de medio: se colocaron cinco ápices por frasco y se sembraron cinco frascos por tratamiento.

Después de 45 días de cultivo, se evaluó porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de enraizamiento, número de brotes, altura de la planta, número de hojas y número y largo de raíces. En todos los casos las condiciones de cultivo fueron 25 ± 2 °C, una intensidad de luz fluorescente de 100 µmoles.cm⁻².s⁻¹ y un fotoperíodo de 16 horas.

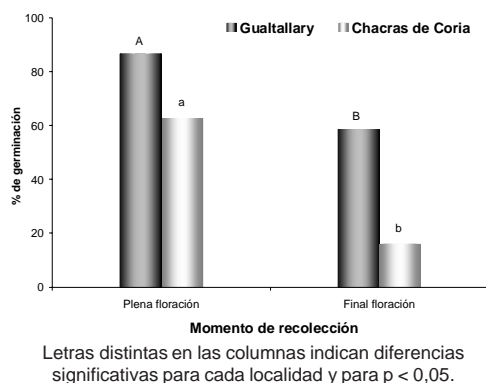
El diseño estadístico fue parcelas al azar, se realizó análisis de la varianza y se aplicó test LSD cuando se encontraron diferencias significativas con $p < 0,05$. Para el análisis de los porcentajes se aplicó el procedimiento de comparación de proporciones. El software utilizado fue Stathistica Plus Versión 4.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de germinación

Como señaló Gutterman (5), la capacidad de germinar de las semillas de muchas especies varía según el ambiente bajo el cual se desarrollan. En coincidencia con el mencionado autor, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de germinación entre las semillas procedentes de Gualtallary (73 %) y de Chacras de Coria (40 %).

En la figura 1 (pág. 95) se presentan los porcentajes de germinación para ambas localidades según el momento de recolección, los cuales son significativamente mayores cuando las semillas se recolectan en plena floración. En Chacras de Coria este valor es aproximadamente 4 veces superior que cuando la recolección es tardía y en la localidad de Gualtallary esta diferencia es de 1,7 veces.



Figra 1. Efecto de la época de recolección sobre la germinación de *L. heterophylla* para ambas localidades.

Para distintas especies de zonas áridas, Gutterman (5) menciona variación en la germinabilidad de semillas provenientes de la misma planta madre aludiendo a diversos factores. Entre ellos: amplitud térmica, temperatura durante la maduración de la semilla, momento de maduración. Si bien no se conocen antecedentes respecto de la variación en la germinación de *L. heterophylla*, la disminución del poder germinativo observada hacia el final de floración se atribuye a un estado de dormición. Este comportamiento respondería a una adaptación para asegurar la permanencia de semillas en el suelo a la espera de condiciones favorables (12).

Ensayos de micropropagación

Establecimiento del cultivo in vitro

En la primera introducción para el establecimiento *in vitro* de *L. heterophylla* no se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia. En el medio de cultivo libre de reguladores las plantas alcanzaron una altura promedio de 3,8 cm y emitieron un solo brote con 3,6 nudos promedio por plantas (tabla 2).

Tabla 2. Efectos de la concentración de BA sobre la sobrevivencia, la altura de planta, el número de brotes y el número de nudos durante el establecimiento *in vitro* de *L. heterophylla* después de 45 días de cultivo en medio MS (n=17).

BA mg.L ⁻¹	% sobrevivencia	Altura de planta (cm)	N° brotes	N° nudos totales
0	81,3 a	3,8 a	1,0 c	3,6 b
0,1	69,2 a	5,5 a	3,7 b	7,2 b
1	57,1 a	4,0 a	11,4 a	23,6 a

letras distintas en cada columna indican diferencia significativa entre tratamiento $p < 0,05$.

En ninguno de los tratamientos se observó la formación de raíces, comportamiento que podría estar relacionado con bajo nivel de auxinas endógenas (4). El número de brotes por planta se incrementó significativamente con el aumento de la concentración de BA, mientras que el número de nudos fue mayor en la máxima concentración ensayada.

Si bien esta especie puede crecer sin citocininas exógenas, el agregado de la misma aumentó notablemente la tasa de multiplicación de 1:3,6 a 1:23,6, efecto altamente favorable en las técnicas de micropropagación. No obstante, las plantas que crecieron con la mayor concentración de BA presentaron tallos engrosados y hojas reducidas.

En muchas especies se ha demostrado que el engrosamiento de tallos y la disminución del tamaño de la hoja son causados por la BA y puede ser revertido con el

agregado de auxinas (9). Por otra parte, una disminución de la concentración de sales en el medio de cultivo puede favorecer el crecimiento *in vitro* de algunas especies (4).

Basados en estos antecedentes y en los resultados previos se planteó una segunda introducción *in vitro*. En este ensayo no se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia (datos no presentados).

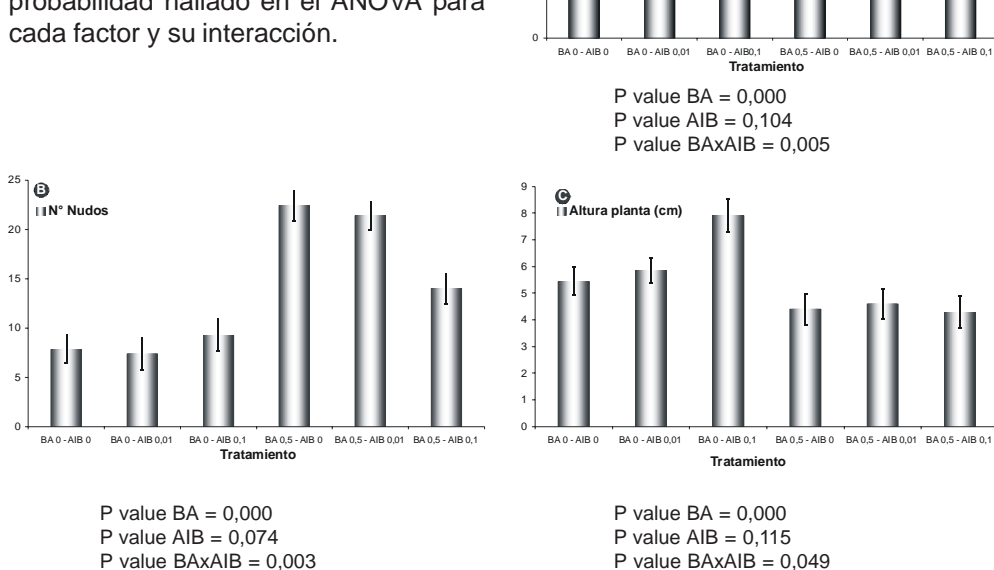
En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos en número de brotes, número de nudos y altura de planta en cada tratamiento además de los valores de significancia para cada factor y la interacción.

El agregado al medio de cultivo de 0,5 mg.L⁻¹ de BA aumentó significativamente el número de brotes y el número de yemas por planta mientras que provocó una disminución de la altura de las mismas tanto en presencia como en ausencia de AIB (figura 2 A, B, C).

El AIB no logró disminuir el efecto detrimental del BA sobre la altura de las plantas, no obstante las plantas crecidas en ausencia de BA y con 0,1 mg.L⁻¹ de AIB alcanzaron la mayor altura (figura 2C).

Figura 2.

Efecto del BA y el AIB sobre el número de brotes, número de nudos y altura de planta durante el establecimiento *in vitro* de *L. heterophylla* después de 45 días de cultivo en medio MS diluido a la mitad n=25. En cada gráfico se presenta el valor de probabilidad hallado en el ANOVA para cada factor y su interacción.



El aumento en la producción de brotes se mejoró al reducir la concentración de BA a 0,5 mg.L⁻¹. Si bien no se observó un aumento significativo del crecimiento de los explantos al reducir la concentración de macronutrientes, dicha reducción representa en sí misma una ventaja al disminuir el costo de la técnica.

Multiplicación

En el ensayo de multiplicación no se encontraron diferencias significativas respecto de la sobrevivencia de los explantos en los distintos tratamientos (datos no presentados). En todos los tratamientos se observó enraizamiento en porcentajes que fueron del 25 al 66,7 %. Estos porcentajes y el largo y número de raíces no fueron significativamente distintos en ninguno de los tratamientos ensayados (tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la concentración de macronutrientes y de sacarosa sobre el porcentaje de enraizamiento y el largo y número de raíces durante la multiplicación *in vitro* de *L. heterophylla* después de 45 días de cultivo (n=25).

Medio de cultivo	Concentración sacarosa g.L ⁻¹	Enraizamiento %	Largo raíces (cm)	Nº raíces
MS 1/2	20	66,7 a	1,9 a	1,7 a
MS 1/2	40	25 a	0,4 a	0,9 a
MS 1/4	20	53,8 a	2,3 a	1,4 a
MS 1/4	40	66,7 a	1,4 a	1,4 a

Letras iguales en las columnas indican que las medias no son estadísticamente diferentes para $p < 0,05$.

La presencia de raíces en esta etapa podría deberse al tipo de explanto utilizado. En muchas especies los brotes jóvenes en desarrollo, como los utilizados en este ensayo, son una rica fuente de auxinas (9), regulador responsable de la iniciación y crecimiento de raíces (11).

La calidad del enraizamiento es un factor de suma importancia en el éxito de la aclimatación y en la uniformidad del producto final. En este ensayo el enraizamiento fue poco satisfactorio, tanto por los porcentajes como por el número de raíces por planta; sería necesario evaluar la suplementación del medio de multiplicación con alguna auxina.

La concentración de macronutrientes en el medio de cultivo solamente afectó la altura de la planta; fue menor cuando se utilizaron diluidos a la mitad, mientras que la mayor concentración de sacarosa disminuyó el número de hojas, el número de nudos y la altura de planta (tabla 4, pág. 98).



Plántula de *L. heterophylla* de 45 días, obtenida en la etapa de multiplicación *in vitro* a partir de ápices.

En la figura 3 (pág. 98) se presentan las medias de cada tratamiento de las variables número de hojas, número de nudos y altura de planta en cm y los respectivos valores de probabilidad hallados en el ANOVA para cada factor y su interacción.

- Los tratamientos MS $\frac{1}{2}$ con 20 g.L⁻¹ de sacarosa, MS $\frac{1}{4}$ con 20 y 40 g.L⁻¹ de sacarosa no produjeron diferencias significativas en la variable número de nudos.
- El tratamiento MS $\frac{1}{2}$ con 40 g.L⁻¹ de sacarosa afectó el crecimiento de las plantas reduciendo la altura y el número de nudos de las mismas.

A los efectos de la micropropagación y teniendo en cuenta los costos, el medio de cultivo más adecuado sería MS $\frac{1}{4}$ con 20 g.L⁻¹ de sacarosa.

Tabla 4.

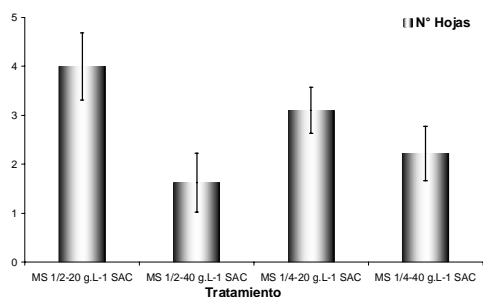
Efecto de la concentración de macronutrientes y de sacarosa sobre el número de hojas, número de nudos y altura de planta durante la multiplicación *in vitro* de *L. heterophylla* después de 45 días de cultivo (n = 50).

Concentración de macronutrientes			
	Nº hojas	Nº nudos	Alt. planta
MS 1/2	2,8 a	6,4 b	3,8 a
MS 1/4	2,6 a	8,2 a	4,9 a
Concentración de sacarosa			
	Nº hojas	Nº nudos	Alt. planta
20 g.L ⁻¹	3,4 a	8,2 a	4,5 a
40 g.L ⁻¹	1,9 b	6,1 b	3,6 b

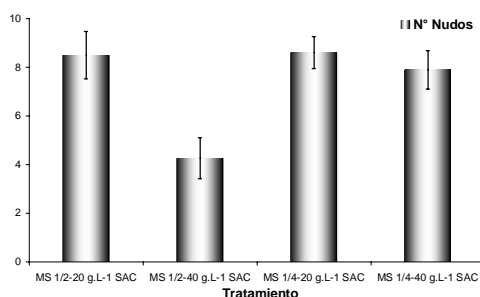
Letras distintas en cada columna indican diferencia significativa entre tratamiento $p < 0,05$.

Figura 3.

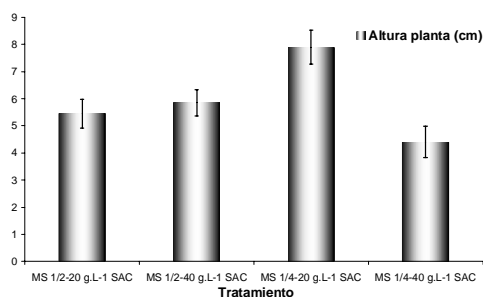
Efecto de la concentración de macronutrientes y sacarosa en el medio de cultivo sobre el número de hojas, número de nudos y altura de planta durante la multiplicación *in vitro* de *L. heterophylla* después de 45 días de cultivo. Abajo de cada gráfico se presenta el valor de probabilidad hallado en el ANOVA para cada factor y su interacción (n=25).



P value MS = 0,783
P value SAC = 0,009
P value MSxSAC = 0,205



P value MS = 0,030
P value SAC = 0,005
P value MSxSAC = 0,041



P value MS = 0,062
P value SAC = 0,008
P value MSxSAC = 0,090

CONCLUSIONES

- ❖ Para *L. heterophylla* la germinación es función no sólo del momento de recolección sino también del ambiente en el cual se desarrolla la planta madre.
- ❖ La época más adecuada para la cosecha de semillas coincide con plena floración.
- ❖ Las semillas recolectadas al final de la floración presentan bajo poder germinativo, por lo que se postula la existencia de algún mecanismo de dormición que será objeto de futuros ensayos.
- ❖ Es posible establecer el cultivo *in vitro* de *L. heterophylla* en un medio de cultivo de MS con macronutrientes diluidos a la mitad y adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 0,5 mg.L⁻¹ de BA.
- ❖ Si bien el mejor medio de multiplicación para esta especie bajo las condiciones de este ensayo fue MS con macronutrientes diluido cuatro veces y adicionado de 20 g.L⁻¹ de sacarosa, sin hormonas, es necesario mejorar el enraizamiento por medio de incorporación al medio de cultivo de auxinas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baskin, C. and Baskin, J. 2001. Types of seed dormancy. In: Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego, California. p. 27-47.
2. Facciuto, G. y Escandón, A. 2003. Desarrollo de germoplasma nativo con interés ornamental. *Idia XXI* 3 (4): 207-210.
3. Fioretti, S.; Ponce, M.; Videla, E.; Cirrincione, M. y Marino, C. 2002. Propagación por estacas de especies nativas: *Glandularia perakii*. I Congreso Argentino de floricultura y plantas ornamentales. IV Jornadas Nacionales de Floricultura. Buenos Aires. Libro de resúmenes. p. 106.
4. Grattapaglia, D. e Machado, M. A. 1998. Micropropagação. En A. C. Torres, L. S. Caldas e J. A. Buso (eds.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Vol.I. Serviço de Produção de Informação-SPI, Brasília. p. 183-260.
5. Gutterman, Y. 2000. Maternal effects on seed during development. In: M. Fenner (ed.). Seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities. 2nd Edition. CAB International. UK. p. 59-84.
6. Krapovickas, A. 2003. Malvaceae, Malváceas. Familia de la Rosa de la China. En: R. Kiesling (dir.), Flora de San Juan. República Argentina. Vol II. Estudio Sigma, Bs. As. p. 108.
7. Marino, C.; Ponce, M.; Videla, E.; Fioretti, S. and Cirrincione, M. 2003. Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (Verbenaceae), native species with ornamental potencial. *Biocell* 27(1): 57-60.
8. Murashige, T. and Skoog, F. M. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
9. Orellana, P. P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: J. N. Pérez Ponce (ed.), Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Santa Clara. Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. p. 151-176.
10. Roig, F. A. 1981. Flora de la Reserva Ecológica de Ñacuñán. Cuad. Téc. IADIZA 3-80: 90-91.
11. Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. 2nd ed. Ed. Sinaver Associates, INC. USA. p. 544-584.
12. Venable, D. L. and Lawlor, L. 1980. Delayed germination and dispersal in desert annuals: escape in space and time. *Oecologia* 46: 272-282.

13. Videla, E.; Fioretti, S.; D'Agostino, L.; Gómez, L.; Savietto, M. y Tonda, M. 2003. Poder germinativo de gramíneas de Mendoza con valor ornamental. 5° Jornadas Nacionales de Floricultura. San Miguel de Tucumán. Publicado en CD.
14. Videla, E.; D'Agostino, L.; Gómez, L.; Savietto, M.; Fioretti, S.; Tonda, M.; Codina, R. y Carrieri, S. 2004. División de matas de *Stipa ichu*. 2° Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 6° Jornadas Nacionales de Floricultura. 1° Encuentro Latinoamericano de Floricultura. INTA. Buenos Aires. Libro de resúmenes. p. 34-36.
15. Videla, E.; Fioretti, S.; Ponce, M.; Codina, R. y Carrieri, S. 2004. Ensayos de germinación de *Lecanophora heterophylla*, nativa con interés ornamental. 2° Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 6° Jornadas Nacionales de Floricultura. 1° Encuentro Latinoamericano de Floricultura. INTA, Buenos Aires. Libro de resúmenes. p. 31-33.